

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-286798

(43)Date of publication of application : 04.11.1997

(51)Int.Cl.

C07K 14/745

A61K 38/00

A61K 38/48

C07K 1/14

(21)Application number : 08-122330

(71)Applicant : CHEMO SERO THERAPEUT RES  
INST

(22)Date of filing : 19.04.1996

(72)Inventor : MORIKAWA WATARU  
MIYAMOTO SEIJI

## (54) PRODUCTION OF ACTIVE PROTEIN COMPOSITION

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To produce a safe active protein composition without containing any infectious contaminating viruses by physically or chemically removing a thermally unstable protein from a solution containing a biologically active protein and inactivating infectious viruses.

**SOLUTION:** A thermally unstable protein part is separated and removed from a solution (e.g. a blood plasma) containing a biologically active protein (e.g. plasminogen) according to a physical or a chemical method, e.g. an enzymic proteolysis and the resultant product after removing the thermally unstable protein part is then heated at a temperature of at least 50°C for at least 10hr in order to sufficiently inactivate all the contaminating infectious viruses. Thereby, the inactivating treatment of the viruses according to a thermal pasteurization to afford the objective safe and biologically active protein composition without substantially containing any contaminating viruses having infectivity.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 31.03.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-286798

(43) 公開日 平成9年(1997)11月4日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/745			C 0 7 K 14/745	
A 6 1 K 38/00	A E D		1/14	
38/48	A D U		A 6 1 K 37/18	A E D
C 0 7 K 1/14			37/47	A D U

審査請求 未請求 請求項の数8 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平8-122330	(71) 出願人	000173555 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
(22) 出願日	平成8年(1996)4月19日	(72) 発明者	森河 亘 熊本県熊本市武蔵ヶ丘7丁目2-18 R T Y タウン
		(72) 発明者	宮本 誠二 熊本県菊池郡西合志町須屋2066-8

(54) 【発明の名称】 活性蛋白質組成物の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 新規な、生物学的に活性な蛋白質組成物の製造方法を提供する。

【構成】 熱に不安定な生物学的に活性な蛋白質を特異的に断片化し、熱に不安定な部分を除去して安定な部分のみを調製し、これを加熱する。

【効果】 生物学的に活性な蛋白質を生理的機能を保持させたまま加熱し、感染性夾雑ウイルスを含まない安全な蛋白質組成物を提供することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a)生物学的に活性な蛋白質を含有する溶液から、物理的あるいは化学的方法によって熱に不安定な蛋白質部分を分離し除去する工程、及び(b)前記工程(a)の熱に不安定な蛋白質部分除去後の生成物を、夾雑する感染性ウイルスのすべてを不活性化するために十分な条件下で処理するウイルス不活性化工程、を含んでなることを特徴とする感染性を有する夾雑ウイルスを実質的に含有しない生物学的に活性な蛋白質組成物を製造する方法。

【請求項2】 工程(a)の熱に不安定な蛋白質部分の分離が、酵素的な蛋白質分解に基づくものである請求項1記載の方法。

【請求項3】 工程(a)の生成物に対して、溶液中に存在する全ての夾雑ウイルスの不活性化を確実にするために十分な条件下に、低温加熱殺菌する請求項1記載の方法。

【請求項4】 低温殺菌工程が、溶液もしくは凍結乾燥状態で、少なくとも50℃の温度において少なくとも10時間加熱することを含む請求項3記載の方法。

【請求項5】 選択的に、糖、アミノ酸、あるいはε-アミノカプロン酸もしくはその塩を共存させる請求項3記載の方法。

【請求項6】 工程(a)の熱に不安定な蛋白質部分除去後の生成物が、プラスミノーゲン分解物質である請求項1~請求項5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 工程(a)の熱に不安定な蛋白質部分除去後の生成物が、プラスミノーゲンのリジン結合断片である請求項6に記載の方法。

【請求項8】 工程(a)の熱に不安定な蛋白質部分除去後の生成物が、フィブロネクチンヘパリン結合断片である請求項1~請求項5のいずれかに記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本願発明は、生物学的に活性な血漿蛋白質組成物の製造方法に関する。とりわけ、血漿から調製される所望の蛋白質に対する夾雑ウイルスの不活化を目的とした加熱処理を含んでなる、所望の蛋白質の製造方法に関する。さらに詳細には、血漿より調製される蛋白質を酵素で断片化し、熱に不安定な部分を除去した後、得られる所望の血漿蛋白質断片を液状あるいは凍結乾燥後の加熱によって夾雑ウイルスを不活性化し、その感染性を除く方法を提供する。従って、本願発明は上記方法によって加熱された蛋白質断片に生化学あるいは医学的意義が存する分野、例えば治療薬、補充療法薬の分野において広く利用される。

## 【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】血漿分画製剤は、多くのヒトの血漿をプールしたものを原料として調製されている。ヒト血漿には、例えば肝炎ウイ

ルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)等の血液を媒介として感染するウイルスが存在することが認められており、それらが血漿分画製剤を通して感染した事例も報告されている。そのため、今日では多くの分画製剤は加熱等による夾雑ウイルスの不活性化工程を経て製造される。夾雑ウイルスの不活性化は、強い物理的・化学的な処理を施すことによって達成されるが、血漿分画製剤の本態をなす蛋白質によってはこれらの処理に対して不安定なものがある。従って、多くの場合、調製した蛋白質を凍結乾燥した後加熱する方法(凍結乾燥加熱)や液状で糖類やアミノ酸類等の蛋白質安定剤存在下で加熱しウイルスを特異的に不活化する方法が実施されている。

【0003】そもそも、蛋白質は基本的にはアミノ酸鎖から成り、各アミノ酸間の相互作用によってその蛋白質に固有の高次構造及びサブユニット構造を形成している。従って、高次構造あるいはサブユニット構造を不可逆的に破壊するような処理は、その蛋白質に対して蛋白質変性を導くような影響を及ぼすことが避けられないものである。本願発明者は、生物学的に活性な蛋白質を形成するアミノ酸残基から熱に対して不安定な部分を事前に除去することでより強力なウイルスの不活性化が可能であるとの視点に立ち、この理論を実証するべく鋭意研究を重ねた。

【0004】本願発明者は、その重要度に鑑み、対象として先ずプラスミノーゲンのリジン結合断片の加熱及びそれに引き続く製造方法について検討した。その理由は以下のとおりである。プラスミノーゲンは分子量80,000の血漿蛋白質で、血液の凝固線溶系に関与する酵素前駆体である。プラスミン、ウロキナーゼ、ティッシュプラスミノーゲンアクチベータ(tPA)等によって限定分解を受け、活性型であるプラスミンに変換され、このプラスミンはフィブリン凝塊物を分解する働きがある。プラスミノーゲンは、その分子中にリジンと結合し得る部分(リジン結合部)と上述の活性発現を担う活性中心が存在する部分に分けることができる。リジン結合断片はフィブリンとの結合に重要な働きを示すもので、かつ、最近その部分に血管新生の抑制の働きがあることが証明された(O'Reilly, M.S et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. Cell, 79, p. 315-328, (1994))。リジン結合断片の血管新生抑制作用は、癌治療最大の問題である癌転移の抑制に当該リジン結合断片の投与が有効であることを示唆しており、この部分を血漿から調製し且つ好適な加熱を行なうことができればウイルス感染等の危険性のない安全な癌転移抑制剤が得られることが期待される。

【0005】プラスミノーゲンは、血漿あるいはそのアルコール分画部分からリジンをリガンドとしたカラムを用いることによって、ほぼ選択的に完全な形態で調製することができる。プラスミノーゲンは、例えばε-アミ

ノカブロン酸存在下で加熱する方法によって安定的に夾雑ウイルスを不活化することができる(特許出願公告昭和62年第35756号)。しかし、これら安定剤はアフィニティークロマトグラフィーの結合を阻害するものであり、所望の物質のアフィニティー精製のためには前記安定剤を除去するために透析等の操作を要する。あるいはその後のプラスミノゲン分解部分を得るための分解工程を必要とする。また、凍結乾燥状態での加熱に関しても、凍結乾燥という特殊な装置を要する操作自体が不可欠であり、さらにこの工程においても蛋白質安定剤の存在を要することがしばしばである。上記の条件を満たさない限り、より強力な条件を加えることはできない。従って、従来の方法でプラスミノゲンをウイルス不活化処理し、そのリジン結合断片を分離するには上述の種々の問題点があり、これを克服するためには何らかの飛躍的な技術が必要であった。

#### 【0006】

【問題を解決するための手段、発明の構成】本願発明は、生物学的に活性な蛋白質の製造方法を提供する。本願発明者等は、プラスミノゲンのうち熱に不安定な部分(活性中心の部分)を蛋白質分解酵素によって分離・分解し、リジン結合断片のみを特異的に採取し、これを加熱した時リジン結合断片の機能を失わせることなくウイルスを選択的に不活化し得ることを見出した。本願発明は上述の知見に基づいて達成されたものである。

【0007】本願発明の方法は、ヒトへの投与を目的とした生物活性を有する多くの蛋白質について適用可能であるが、血漿蛋白質の混合物からプラスミノゲンを分離しこれを選択的に分解して所望のプラスミノゲンリジン結合断片を得、夾雑ウイルスを加熱不活化してプラスミノゲンリジン結合断片組成物を製造すること、もしくは、血漿蛋白質の混合物からフィブロネクチンを調製しこれを選択的に分解してフィブロネクチンのヘパリン結合断片を得、夾雑ウイルスの加熱不活化処理後所望のフィブロネクチンヘパリン結合断片組成物を製造することに対して特に適する。以下、生物学的に活性な蛋白質としてプラスミノゲンを例に取り、本願発明を解説する。

【0008】本願発明の方法は、加熱処理に先立ちプラスミノゲンを酵素的に分解して熱に対して不安定な部分を除去し、その後加熱処理することに大きな特徴を有する。図1に本願発明の概略を示した。図1に示したように、プラスミノゲンには熱に安定な部分と不安定な部分がある。プラスミノゲンをそのまま加熱した場合、安定な部分の蛋白質も不安定な部分に巻き込まれ、それに引きずられて熱変性を起こしてしまう。この状態のものは、酵素の基質特異的な切断を受けずさらなる調製を不可能にする。しかし、加熱する前に予め不安定部分を切断し除去した場合には、加熱に対して寛容になる。

【0009】本願発明の方法の手順は、大略3つの工程よりなる。

①調製されたプラスミノゲンの選択的分解:プラスミノゲンを選択的に分解し、生物活性を有し夾雑ウイルス加熱不活化の対象となるプラスミノゲンリジン結合断片を生成させる。

②プラスミノゲンの熱不安定部分の除去:上記選択的分解によって生じた熱不安定部分を溶液系から除去する。

③夾雑ウイルスの不活性化:

【0010】本願発明の対象の一例となる生物活性を有する蛋白質の母体物質であるプラスミノゲンは、報告されているいくつかの方法に従って調製することができ、その調製に際しては特別の制約はない。好適な例として、新鮮凍結血漿よりリジンを担体に結合させたクロマトグラフィー(リジクロマトグラフィー)を用いて調製することができる(Chibber, B. A. K. et al., *Plasminogen Methods in Enzymology*, 34, p. 424-432)。

【0011】次に、調製されたプラスミノゲンを限定的に分解して、熱に安定なリジン結合断片と熱に不安定な断片に分解する。この分解は、例えば、Gross等(Gross et al., *J. Biol. Chem.*, 237, p. 1856-(1962))に報告されているようなプロモシアンによる化学的切断等も適用され得るが、反応の選択性の観点からエラストーゼ等の酵素による選択分解は好ましい態様である(Davidson J. F. et al., *Raven Press, New York*, 3, p. 191-209, (1978))。エラストーゼを担体に固定したレジンに好適な反応比、例えば酵素基質比が1:100でプラスミノゲンを反応させ、後処理後、反応液をリジクロマトグラフィーに通液して素通り画分を分取する。レジンを吸着したプラスミノゲンリジン結合断片(Plasminogen Lysine Binding Site)を適当な、例えば20mMアミノヘキサン酸を含む溶出緩衝液で溶出して分取する。必要な場合は、分取液を分子ふるい(ゲル濾過)クロマトグラフィーによって所望の分子量を有する蛋白質画分を得る。

【0012】得られたプラスミノゲンリジン結合断片を含有する溶液に対して、好適な手段によって夾雑の可能性のある感染性ウイルスの不活性化の工程が施される。感染性ウイルスの不活性化は、一般に汎用されている加熱不活化処理が適用され得る。溶液状態もしくは凍結乾燥状態での低温加熱殺菌が推奨され、少なくとも50℃の温度において少なくとも10時間加熱することが要求される。加熱に際して、必要な場合、糖、アミノ酸あるいはε-アミノカブロン酸もしくはその塩等を共存させると、目的の生物活性を有する蛋白質の活性低減を抑制することが可能となる。かくして、本願発明の方法により、加熱による該蛋白質の活性の低下が認められずさらに感染性夾雑ウイルスが不活化された、有効且つ安全性が保証されたプラスミノゲンリジン結合断片を含有する組成物が提供される。

【0013】上述のリジン結合断片と同様に蛋白質を断片化することによって新しい活性が認められるものにフィブロンネクチンのヘパリン結合断片がある。Homandberg等はフィブロンネクチンをCathepsin及び $\alpha$ -thrombinで限定分解後、分子中の29K-daからなるヘパリン結合断片を調製し、その断片に血管新生阻害効果があることを示した(Homandberg G.A. et al., Am. J. Pathol., 120, p. 327-332(1985))。フィブロンネクチンも前述のリジン結合断片と同様に熱に対して不安定な物質の一つである。本願発明者は、フィブロンネクチンから上述のHomandberg等の方法に従い、フィブロンネクチンヘパリン結合断片を調製し、これに対して60℃で10時間の液状での加熱を行なった。

【0014】加熱した結果、対照のフィブロンネクチン及びCathepsinによって得られる72K-da断片は蛋白変性を起こし、濾過後の蛋白回収率は5%以下であったのに対し、29K-daは液の白濁化を認めず、蛋白の回収率は90%以上であった。また、フィブロンネクチン及び72K-da断片の熱変性沈澱に $\alpha$ -Thrombinを作用させてみても、29K-da断片は理論値の10%にも満たない回収率であった。加熱前後の29K-da断片を血管内皮細胞の増殖系に添加し、その抑制効果を評価したところ、加熱したヘパリン結合断片は非加熱のそれと同等の活性を示した。

【0015】本願特許発明の適用に関して、血漿蛋白質のうちプラスミノゲン及びフィブロンネクチンを例示して記したが、その範囲はこれらに制約されることはない。つまり、最近のレセプターとリガンドの概念には、蛋白質全体の機能のほかにそのリガンドとしての活性が注目されているものがある。リガンドとなる部分はその蛋白質の一部分であり、本法と同様に、酵素的に蛋白質を断片化してその部分を血漿蛋白質から調製できる場合がある。当該リガンド部分を製剤化する際、加熱処理が実施されるが、本願発明によってもたらされる方法と同様の加熱が行なわれた場合もこれに該当する。また、生体内に微量に存在する熱に安定な断片を、不安定断片を熱処理し除去することによって選択的に調製することも可能である。

【0016】以下、本願発明の理解を深めるために実施例に沿って説明するが、本願発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

#### 【0017】

##### 【実施例】

##### 実施例 1

(プラスミノゲンの調製)新鮮凍結血漿10リッターに20mMベンツアミジン、1mMPMSF、100U/mlアプロチニン(トラジオール(バイエル社))を加え室温で冷融解を行なった。その後、浮遊物を高速遠心機(ミニ精工 RS-20IV)で8,000rpm、4℃、20分間遠心処理し上清を得た。上清を、50mM Tris/0.5M NaCl(pH7.

5)で平衡化したリジン-セファロース(Lysine-Sepharose) 4Bカラム( $\phi$ 5.0 x 30cm, ファルマシア社製)に流速1.0 ml/minで通液し、さらに5倍容の同緩衝液で洗浄した。その後、緩衝液を10mMアミノヘキササン酸を含む同緩衝液に代え溶出した。溶出液は、0.1M 炭酸アンモニウム緩衝液に対して4℃で一晩透析した。

##### 【0018】実施例 2

(エラスターゼ-Sepharoseの調製)エラスターゼ(シグマ社製 Tyep IV:From Porcine Pancreas) 50mgを0.5M NaClを含む0.1M炭酸水素ナトリウムで溶解後、さらに一晩4℃で同緩衝液に対して透析した。エラスターゼを固定化するゲルはCNBr-Activated Sepharose 4 Fast Flow(ファルマシア社製)を用い、そのカップリングは、5mg Elastase/ml Gelの用量で使用説明書に従って行なった。

##### 【0019】実施例 3

(プラスミノゲンエラスターゼ分解物(= プラスミノゲン, LBS-I, LBS-II)の調製)実施例1のリジンアフィニティーゲルによって調製したプラスミノゲンを、Davidson等の方法に従い実施例2で調製したエラスターゼで分解し(Davidson J.F. et al., Raven Press, New York, 3, p. 191-209, (1978))、引き続きリジンアフィニティーゲルによってプラスミノゲンのエラスターゼ分解物を分離した。すなわち、精製プラスミノゲン10mg/mlにアプロチニン100U/ml(トラジオール、バイエル社)を加え、0.1M炭酸アンモニウムに溶解した。これにエラスターゼ-Sepharoseを酵素基質比が1:100になるように加え、25℃で一晩攪拌させながら反応させた。反応終了後、反応液をガラスフィルターで濾過し、濾液を0.1M炭酸アンモニウム緩衝液で平衡化させたリジン-Sepharose(ファルマシア社)に通液し、同緩衝液で洗浄した。素通り画分(= プラスミノゲン)は、フラクションコレクター(LKB社 Redirac E)で採取した。リジン-Sepharose結合画分は20mMアミノヘキササン酸を含む同緩衝液で溶出した。素通り画分及び結合画分(Plasminogen Lysine Binding Site I;以下LBS-I, Plasminogen Lysine Binding Site II;以下LBS-II、混合液)をそれぞれプールした後、限外濾過膜(YM-10 Amicon社製)で濃縮し、0.1M炭酸ナトリウム及びリン酸緩衝液(pH7.2)でそれぞれ一晩冷房で透析した。濃縮した結合画分は0.1M炭酸アンモニウムで平衡化したSephadex G-75 (ファルマシア社製)  $\phi$  5.0 x 40cmに通液し、LBS-I(前画分)、LBS-II(後画分)を分離した。

##### 【0020】実施例 4

(プラスミノゲンリジン結合断片の加熱)リジン結合断片(LBS-I画分)を精製水で透析した後、各々3mlをバイアルに分注し、100℃で煮沸して所定の時間ごとにサンプリングした。

##### 【0021】実施例 5

(蛋白質の安定性(リジン結合能の保持)の評価)実施例4

の方法で加熱したLBS-I画分をLysine-リガンドカラムに通液し、Lysine-リガンドへの非結合画分と結合画分量を検討することによって、LBS-I画分の本来有するリジン結合能を比較した。50mM Tris/0.1M NaCl/5mM EDTA (pH 7.5)の緩衝液で平衡化されたLysine-Sepharose 4カラム( $\phi 1.5 \times 15\text{cm}$ )に通液し、同緩衝液で洗浄後、20mMアミノヘキサン酸を含む同緩衝液でグラジエント溶出した。なお、洗浄時及び溶出時の280nmでの吸光度はモニターし、溶出の面積比をもってその安定性を評価した。図2に加熱、非加熱のリジン結合断片のリジン-Sepharose 4Bからの溶出パターンを示した。図に示すように、100°C、3分の加熱でリジン-Sepharoseに非吸着の蛋白質量は全体の5%にも満たないものであり、且つカラムからの溶出パターンは非加熱の蛋白質のそれと同一であった。

#### 【0022】実施例 6

(蛋白質の生物活性の評価)加熱したリジン結合断片の生物活性について、O'Reilly等の方法に従いリジン結合断片の血管新生阻害作用を血管内皮細胞の増殖能を用いて評価した。すなわち、Folkman等(Folkman, J., Haudenschild, C. C., and Zetter, B. R. Long-term culture of capillary endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, p. 5217-5221, (1979))の方法に従い、取得及び管理した血管内皮細胞を2,500cells/mlに調製し、細胞を24ウェルのプレート(ヌンク社製:NUNC)に0.5ml/wellで播種し、24時間37°CのCO<sub>2</sub>インキュベータ(CO<sub>2</sub>濃度 10%)で培養した。0.25mlのDMEM、5%BCS、1%カナマイシンを含む培地に実施例4で加熱したリジン結合断片を10 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、さらに20分間培養した。その後、1ng/mlFGFを含む同緩衝液を加え全量を500 $\mu\text{l}$ にした後、さらに72時間培養した。なお、対象としては加熱を行っていないリジン結合断片を加えた。培養後、ウェルをトリプシンで剥離した後、細胞数を計測した。その結果、リジン結合断片を添加していない対照を100%とした場合、加熱断片は56%、非加熱断片は58%の血管内皮細胞の抑制効果を示し、加熱したリジン結合断片は非加熱のそれと同等の血管内皮細胞増殖抑制効果が確認された。

#### 【0023】実施例 7

(蛋白質の生物活性、動物試験での評価:in vivoでの血管新生阻害効果の比較)in vivoでの血管新生阻害効果はAbe等の方法を用い、dorsal airsac法で評価した(Abe T. et al., J. Clin. Invest. 92, p. 54-61(1993))。即ち、C57BL6/Jマウスの背部皮下にミリポアチャンバーを左右2個挿入し、マウスルイス肺癌3LL-SA1 $\times$ 10<sup>6</sup>個をこのチャンバーに注入した。この際、一方のチャンバーには腫瘍細胞を注入せず対照とした。実施例4の方法で調製した加熱したプラスミノゲンリジン結合断片及び非加熱の断片を1mg/kgでマウスの腹腔内に投

与し、5日間飼育した。新生血管はミリポアチャンバー直下の血管を画像解析装置に入力し、その面積(占有率)を比較した。プラスミノゲンリジン結合断片非投与群の血管占有率は対照チャンバーが15.0 $\pm$ 4.3%、腫瘍挿入チャンバーで30.3 $\pm$ 5.8%であったのに対して、加熱断片投与群は対照チャンバーが16.1 $\pm$ 8.4%、腫瘍挿入チャンバーで20.6 $\pm$ 7.7%であり、非加熱断片投与群は対照チャンバーが19.8 $\pm$ 10.4%、腫瘍挿入チャンバーで22.3 $\pm$ 9.0%であり、腫瘍に由来する血管新生を抑制していた。

#### 【0024】実施例 8

(蛋白質の生物活性、動物試験での評価:肺転移の増殖抑制効果の比較)C57BL6/Jマウスの背部皮下にルイス肺癌(LL/2)を10<sup>6</sup>cells移植後、その重量が500~700mgに達した時点で腫瘍を摘出し、更に14~17日間飼育した。以後、実施例4の方法で調製した加熱したプラスミノゲンリジン結合断片及び非加熱の断片を1mg/kgでマウスの腹腔内に毎日投与し、更に7~10日間飼育後肺を摘出し、肺転移増殖を肺転移数及び重量を測定し比較した。なお、対照としては、プラスミノゲンリジン結合断片の代わりに生理食塩水を100 $\mu\text{l}$ 投与した。肺重量は非加熱断片投与群で0.24 $\pm$ 0.06gであったのに対して、加熱断片は0.25 $\pm$ 0.12gであり、対照群の0.59 $\pm$ 0.43gに較べ共に腫瘍の増殖を抑制していた。

#### 【0025】実施例 9

(ウイルスの不活化試験)実施例4で調製したリジン結合断片溶液に1/10量のPseudorabies Virus 10<sup>8.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mlを添加し3分間水浴上で煮沸した。感染価の測定はVero細胞を用い、50%感染終末点(TCID<sub>50</sub>)法を用いて行なった。加熱前に10<sup>7.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mlのウイルスを含む溶液が、3分間100°Cの加熱後は10<sup>0.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mlとなりウイルスは速やかに不活化されていることが確認された。

#### 【0026】実施例 10

(フィブロンекチンにおける評価)

##### 1. フィブロンекチン断片の調製

原料とするフィブロンекチンは、Homandberg等の報告(Homandberg G. A. et al., Arch. Biochem. Biophys. 238, p. 652-663(1985))の記述に従って調製した。ヒト血漿よりゼラチンSepharoseで精製し、部分還元したものを使用した。0.1Mホウ酸緩衝液(pH 3.7)で0.8 $\mu\text{g/ml}$ のCathepsin D(Sigma社製)と1mg/mlのフィブロンекチンを30°C3時間反応させた後、反応を終了させ、ゼラチンSepharoseに通液してその結合断片(72K-da分子)を回収した。結合断片を50mMNaCl/20mMTris緩衝液(pH 7.4)で透析後1Uの $\alpha$ -Thrombinと反応させ、さらに29K-daの断片と50K-daの断片に分解した。29K-daの断片はゼラチンSepharoseの非結合画分として得られた。

### 【0027】 2. フィブロネクチン及びフィブロネクチン断片の加熱

フィブロネクチン及びフィブロネクチン断片(72K-da, 29K-da)は生理食塩水に透析後、60℃で10時間、液状で加熱した。なお、60℃で10時間の加熱条件はヒト血清アルブミンで肝炎ウイルス等のウイルス伝播を阻止し得る条件である。加熱した各検体は、3,000rpmで遠心後、メンブランフィルター(MILEX-HA 0.45µm: ミリポア社製)で濾過し、その回収率は蛋白質量を測定して求めた。上述の方法で調製した加熱後の72K-da蛋白質断片を、Furie等の方法に従い、さらにα-Thrombinで分解し29K-daの蛋白質断片を調製した(Furie M.B. et al., J. Biol. Chem., 255, p. 4391-4394(1980))。

### 【0028】 3. 加熱による蛋白の変性

加熱した結果、フィブロネクチン及び72K-da断片は蛋白変性を起こし、濾過後の蛋白回収率は5%以下であったのに対し、29K-daは液の白濁化を認めず、蛋白 \*

の回収率は90%以上であった。また、フィブロネクチン及び72K-da断片の熱変性沈澱にα-Thrombinを作用させてみても、29K-da断片は理論値の10%にも満たない回収率であった。

### 【0029】 4. フィブロネクチン断片(29K-da)の加熱前後の活性の評価

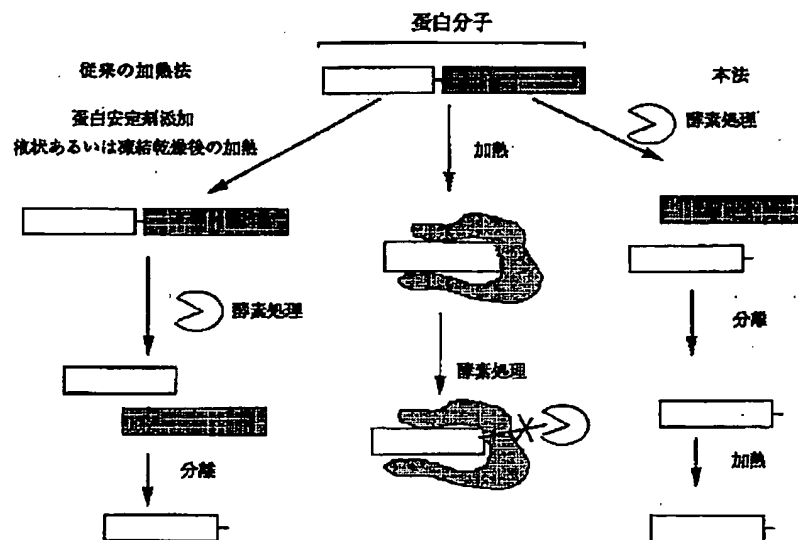
実施例6に記載の方法に準じて、加熱前後の蛋白断片(29K-da)の血管内皮細胞増殖抑制効果を判定した。加熱前後の29K-daを実施例6で示した血管内皮細胞の増殖系に添加し、その抑制効果を評価した結果、加熱したヘパリン結合断片は非加熱のそれと同等の活性を示した。

### 【図面の簡単な説明】

【図1】 本願発明の概念を示す図である。

【図2】 プラスミノノーゲンリジン結合断片の加熱前後でのリジンへの結合能を示す図である。

【図1】



【図2】

